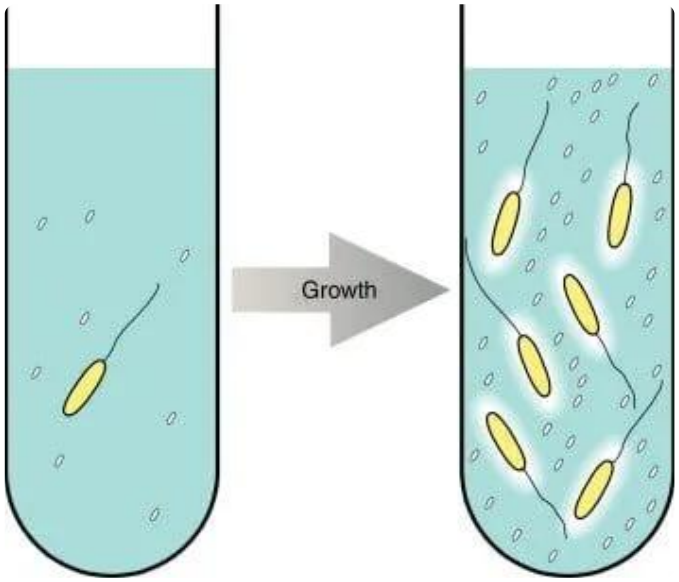


https://biokimicroki.com/methods-for-measuring-bacterial-growth/

Crecimiento microbiano

© Olga Rivas Solano
2026

Agenda

Semana N°2 23-27 febrero	2. Crecimiento microbiano	**Sesión presencial** • 8:30 – 9:30 am: Exposición de tarea grupal #1 por parte de estudiantes. • 9:30 -10:30 am: Clase magistral, parte 1. • 10:30-10:40: Receso. • 10:40-11:20 am: Análisis de problemas.	• Exponer tarea grupal #1 • Recibir clase magistral. • Participar en la actividad de análisis de problemas.	• Entrega y exposición de tarea grupal #1 (2%)

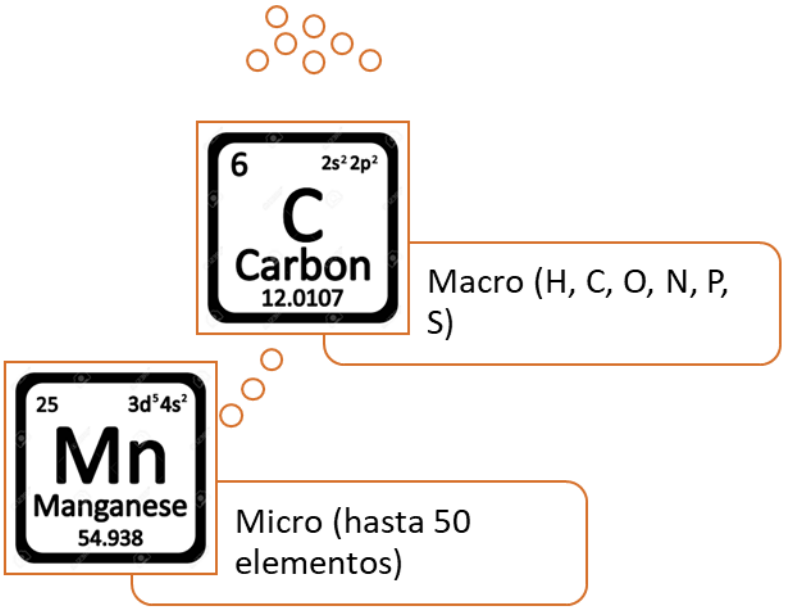
Subtemas sobre "Crecimiento microbiano"

1. Nutrición microbiana.
2. Medios de cultivo.
3. Métodos para la medición del crecimiento microbiano.
4. Curva de crecimiento microbiano y sus fases.
5. Factores que afectan el crecimiento microbiano.

1. Nutrición microbiana

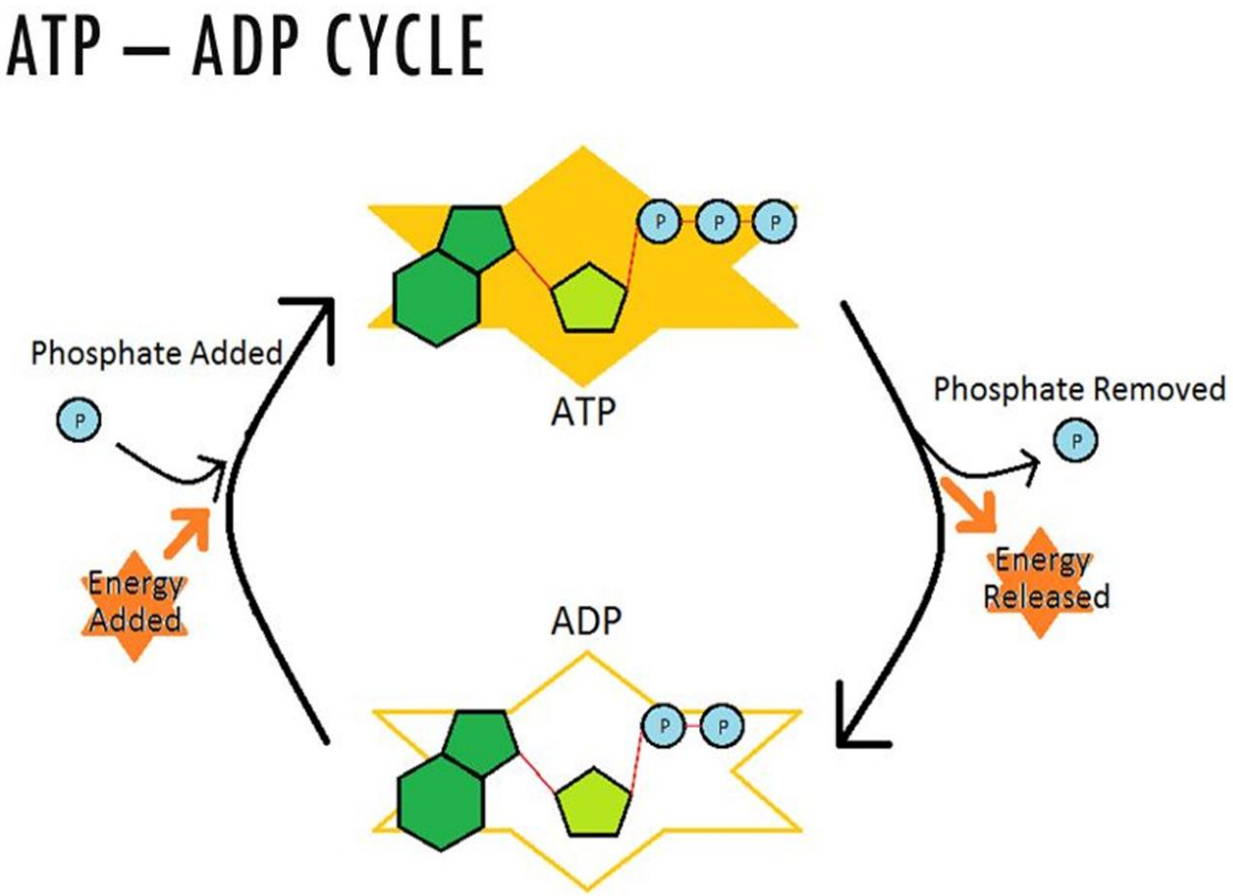
- La nutrición microbiana es la rama de la fisiología que estudia los compuestos químicos (nutrientes) que los microorganismos necesitan para su crecimiento.
- El crecimiento microbiano es el aumento en el número de células asociado a la división celular.

Nutrientes



- Los macronutrientes se utilizan para **sintetizar macromoléculas** durante el crecimiento.
- El **carbono** se usa también como **fuente de energía** y representa aproximadamente el **50% del peso seco** de un microorganismo.
- Los micronutrientes sirven como **cofactores** para algunas enzimas.

Conservación de la energía de los nutrientes mediante síntesis de compuestos con enlaces de alta energía:



La síntesis de ATP es realizada por la enzima ATPasa y requiere ADP, un grupo fosfato y una fuente de energía que proviene del transporte de electrones en la membrana citoplasmática.

Clasificación de los microorganismos por:

Fuente de carbono para la obtención de energía:

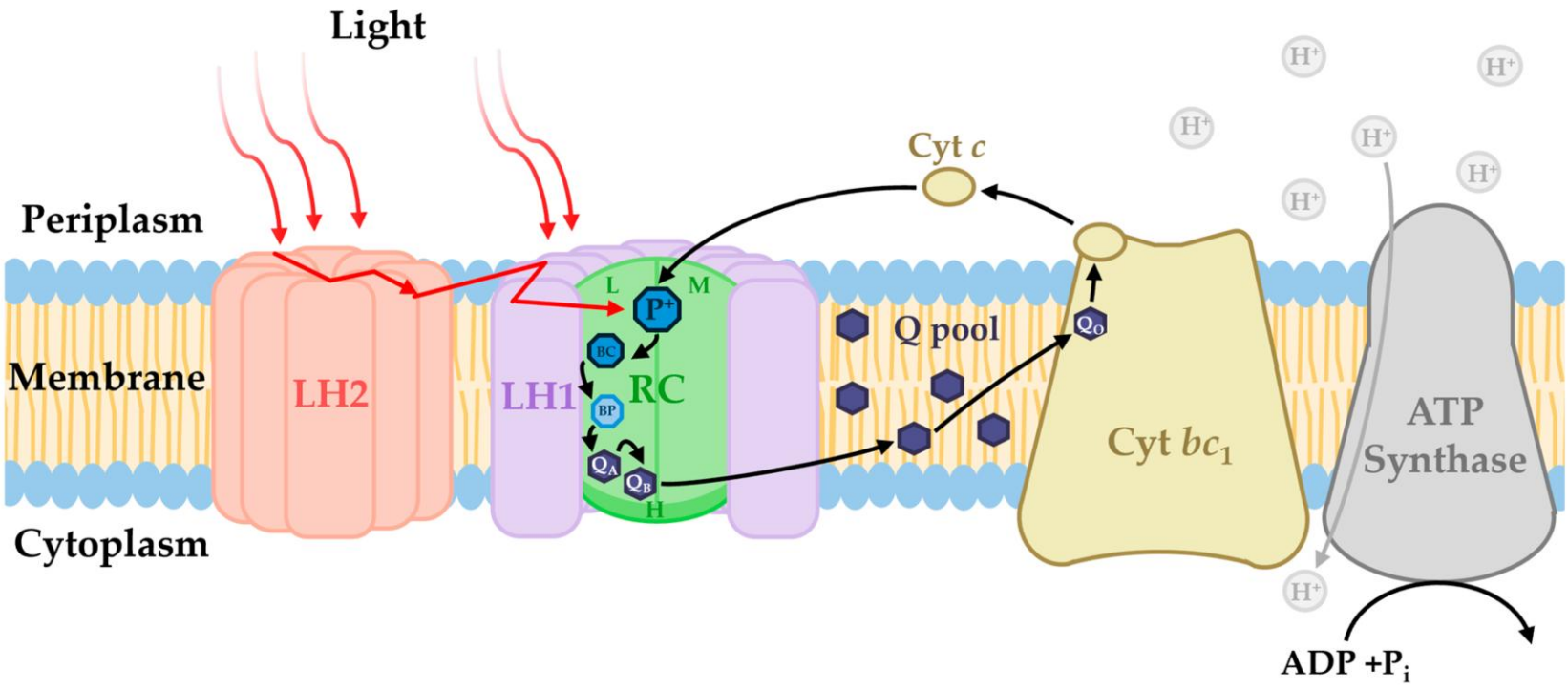
- **Autótrofos**: CO_2 como única o principal fuente.
- **Heterótrofos**: moléculas orgánicas preformadas (ej. Glucosa)

Fuente de electrones para la conservación de la energía:

- **Fotótrofos:** Usan la luz.
- **Quimiótrofos:** usan las reacciones REDOX del metabolismo como fuente de electrones.

Existe gran diversidad de fotótrofos y mecanismos para captar luz

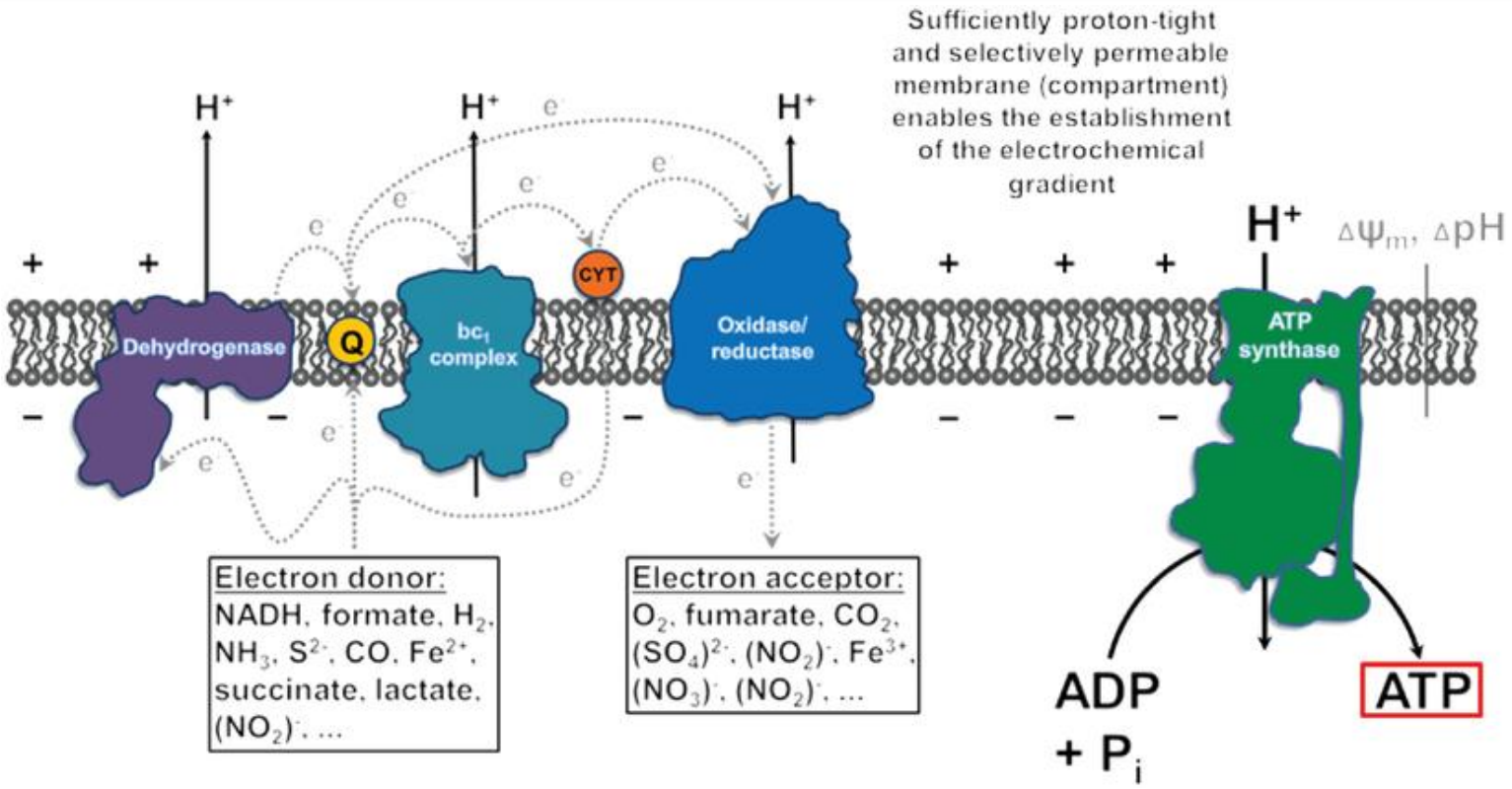
- En general, tienen en común la presencia de complejos formados por proteínas y pigmentos que absorben luz y canalizan esa energía hacia el centro de reacción donde se inicia la separación de cargas y la conservación de la energía en forma de ATP.



https://doi.org/10.3390/microorganisms13112446

Quimiótrofos: usan las reacciones REDOX del metabolismo como fuente de electrones para conservar energía

- Los electrones pasan desde moléculas donadoras a aceptoras mediante una cadena de enzimas respiratorias. Este flujo de electrones permite el bombeo de protones a través de la membrana, generando una fuerza motriz que es aprovechada para producir ATP.



https://doi.org/10.1002/adbi.201800323

Hay dos tipos de quimiótrofos:

Quimioorganótrofos

- Usan moléculas orgánicas como donadores de e- (ej. glucosa).

Quimiolitótrofos

- Usan moléculas inorgánicas como donadores de e- (ej. SH_2, NH_3, Fe).

¿Porqué es importante estudiar los sistemas microbianos de conservación de energía?

1. Ofrecen modelos inspiradores para el diseño de tecnologías artificiales de captura y transferencia de energía. Ejemplos:

Tipo de bacteria	Fuente de energía	Tecnología inspirada
Fotótrofas	Luz	Bio-celdas solares, fotobioelectroquímica
Quimiótrofas	Compuestos químicos	Celdas de combustible microbianas
Quimiolitótrofas	Inorgánicos	Bioelectrosíntesis, catalizadores bioinspirados

2. Estos sistemas son fundamentales para la supervivencia de los microorganismos y tienen componentes muy específicos, por lo que sirven como blancos para el diseño de nuevos antimicrobianos.

Ej. Bedaquilina: inhibe directamente la síntesis de ATP en *Mycobacterium tubeculosis*

2. Medios de cultivo

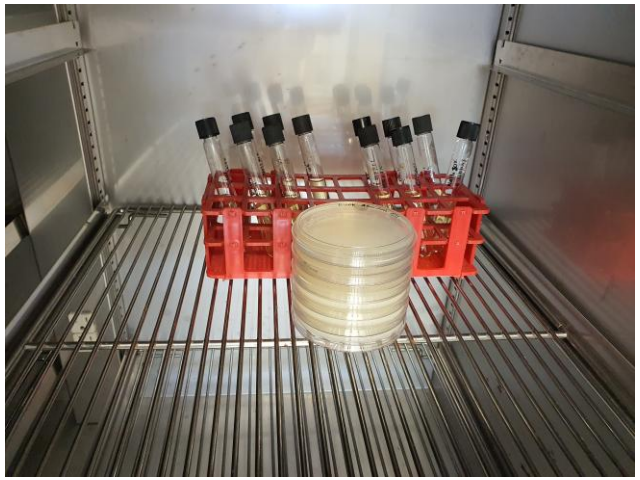
- Los medios de cultivo se pueden clasificar según su:

  - Estado
  - Composición
  - Función

2. Medios de cultivo

- Los medios de cultivo se pueden clasificar según su:

➢ Estado
  - **-Líquidos**: caldos.
  - **-Sólidos**: contienen agar al 1.5%.
  - **-Semi-sólidos**: contienen agar al 0.4%.



2. Medios de cultivo

6.5 g/l $Na_2HPO_4.H_2O$
3 g/l KH_2PO_4
1 g/l NH_4Cl
0.5 g/l NaCl
2 ml/l $MgSO_4$ (1M)
1 ml/l $CaCl_2$ (1M)
1 ml/l Tiamina (1M)
5 g/l Glucosa
15 g/l Agar

3 g/l Extracto de carne
5 g/l Peptona
15 g/l Agar

- Composición
- Función

-**Definidos**: se sabe exactamente su composición.
-**Indefinidos**: están formulados a base de extractos cuya composición exacta no se conoce.

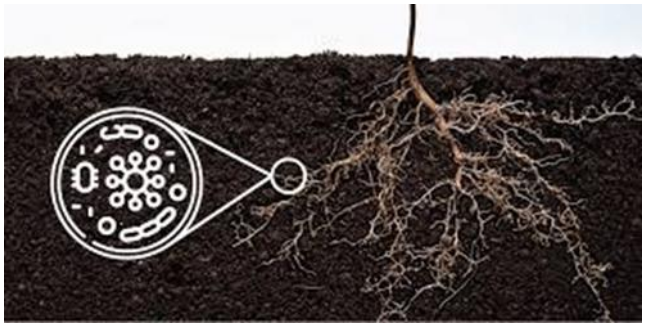
2. Medios de cultivo

- Los medios de cultivo se pueden clasificar según su:

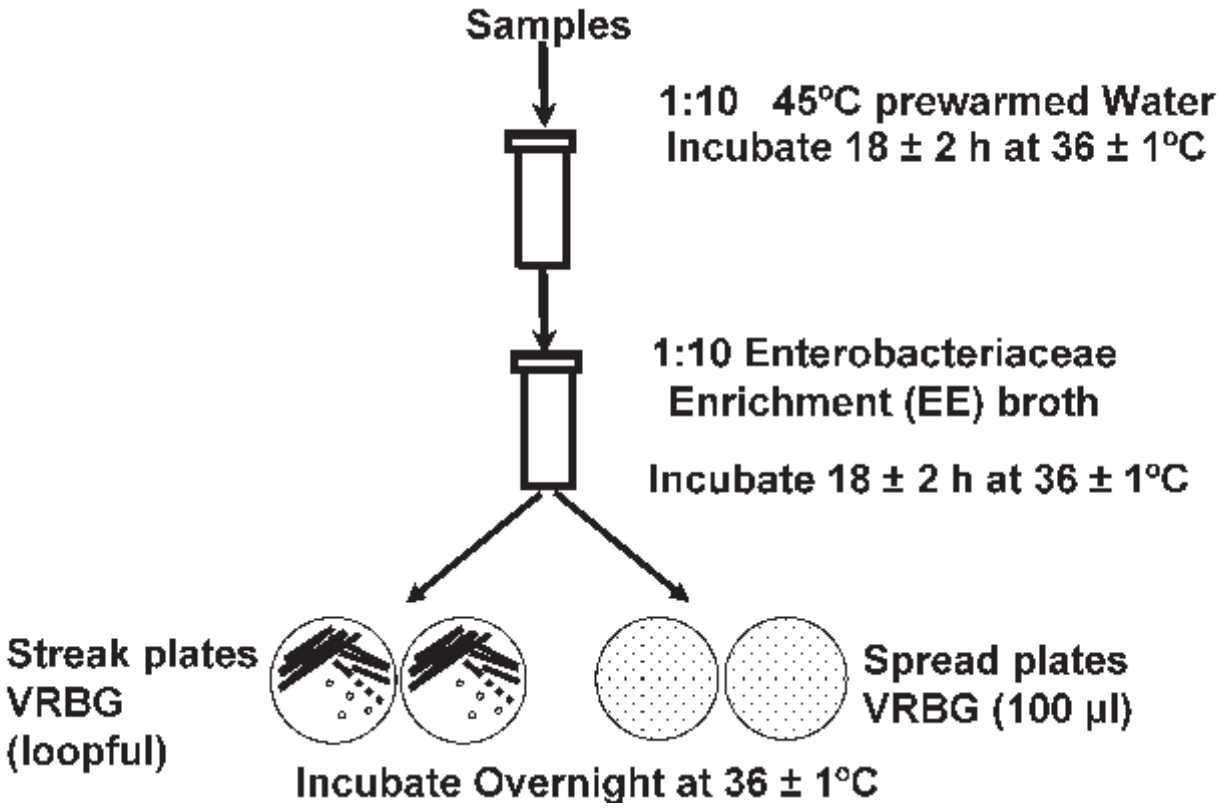
  - Estado
  - Composición
  - Función
    - -Enriquecimiento
    - -Selectivos
    - -Diferenciales
    - -General

Medios de enriquecimiento

- Se usan en muestras con mucha diversidad microbiana, en las cuales el microorganismo de interés está en baja concentración con respecto a los demás. Por ejemplo: suelos y alimentos.



- El medio de enriquecimiento permite que el microorganismo de interés crezca más, de forma que su concentración aumenta y se facilita su aislamiento.
- BAM: Bacteriological Analytical Manual.



https://www.researchgate.net/figure/Schematic-summary-of-the-reference-FDA-method_fig2_44662746

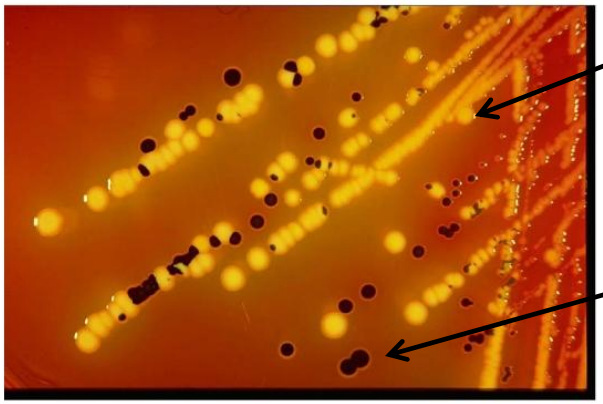
Medios selectivos

- Contienen nutrientes que favorecen el crecimiento del microorganismo de interés y además contienen compuestos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos que pueden estar presentes en la muestra.
- Ejemplo: Agar "Brilliance Bacillus cereus".

Permite el desarrollo de *B. cereus* y *B. thuringiensis*, pero inhibe el crecimiento de otras bacterias ya que contiene Polimixina B y Trimetoprim (antibióticos).

Medios diferenciales

- Contienen algún compuesto que permite diferenciar o reconocer el crecimiento de uno o más microorganismos de interés.
- Ej: Agar XLD (*xylose, lisine & deoxycholate*).



XLD Agar

Escherichia coli **(yellow colonies)**
Salmonella **sp. (black colonies)**

Permite reconocer el crecimiento de *E. coli*, ya que contiene rojo de fenol que vira a amarillo cuando esta bacteria fermenta la xilosa.

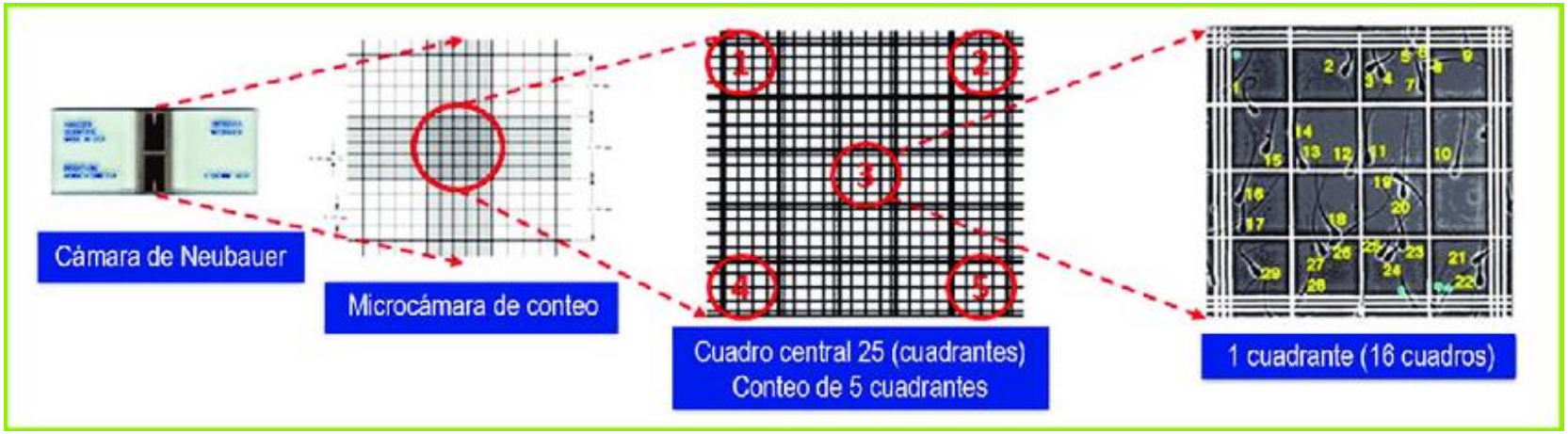
Permite diferenciar colonias de *Salmonella*, ya que esta bacteria reduce el azufre del medio a sulfuro de hidrógeno, el cual reacciona con el tiosulfato de hierro (sal presente en el medio), generando un precipitado negro de sulfuro de hierro.

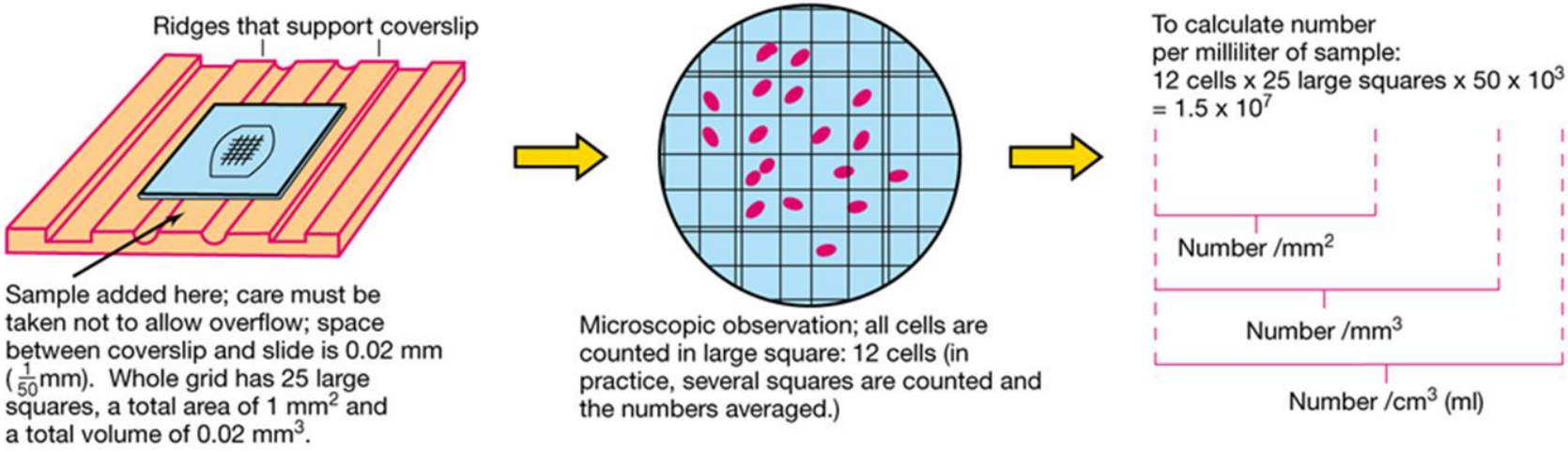
3. Medición del crecimiento microbiano

- Existen varios métodos:
  - ➢ Contaje total de células (Cámara de Neubauer)
  - ➢ Diluciones seriadas y conteo de unidades formadoras de colonias = UFC (viables)
  - ➢ Densidad óptica (Espectrofotómetro)
  - ➢ Peso seco

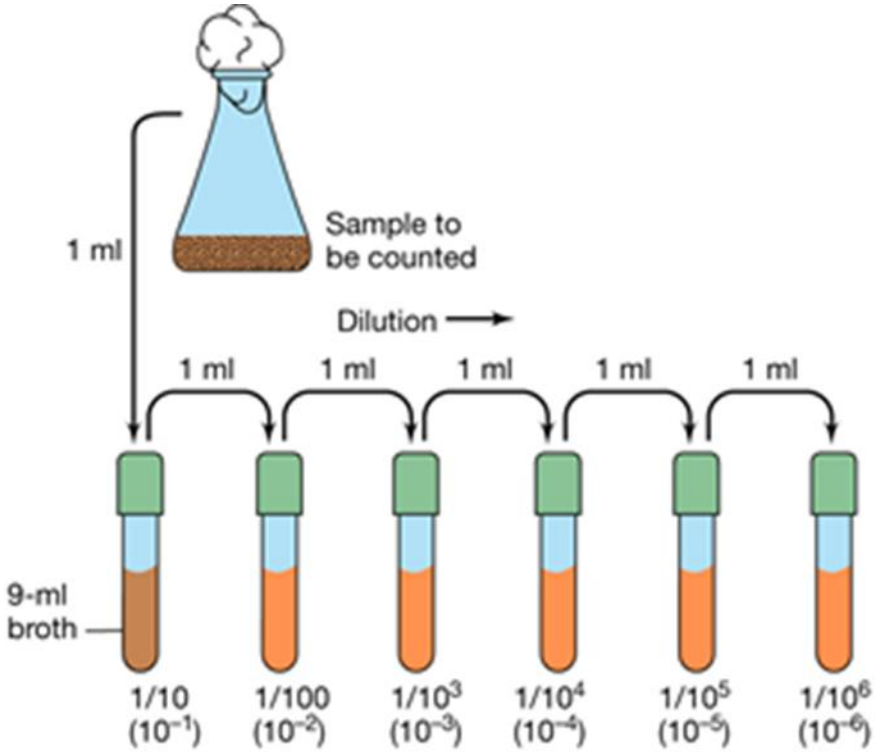
Contaje total de células (Cámara de Neubauer)

- Ventajas: Rápido y directo.
- Desventaja: No permite diferenciar entre células vivas y muertas.


Cámara de Neubauer
Microcámara de conteo
Cuadro central 25 (cuadrantes)
Conteo de 5 cuadrantes
1 cuadrante (16 cuadros)

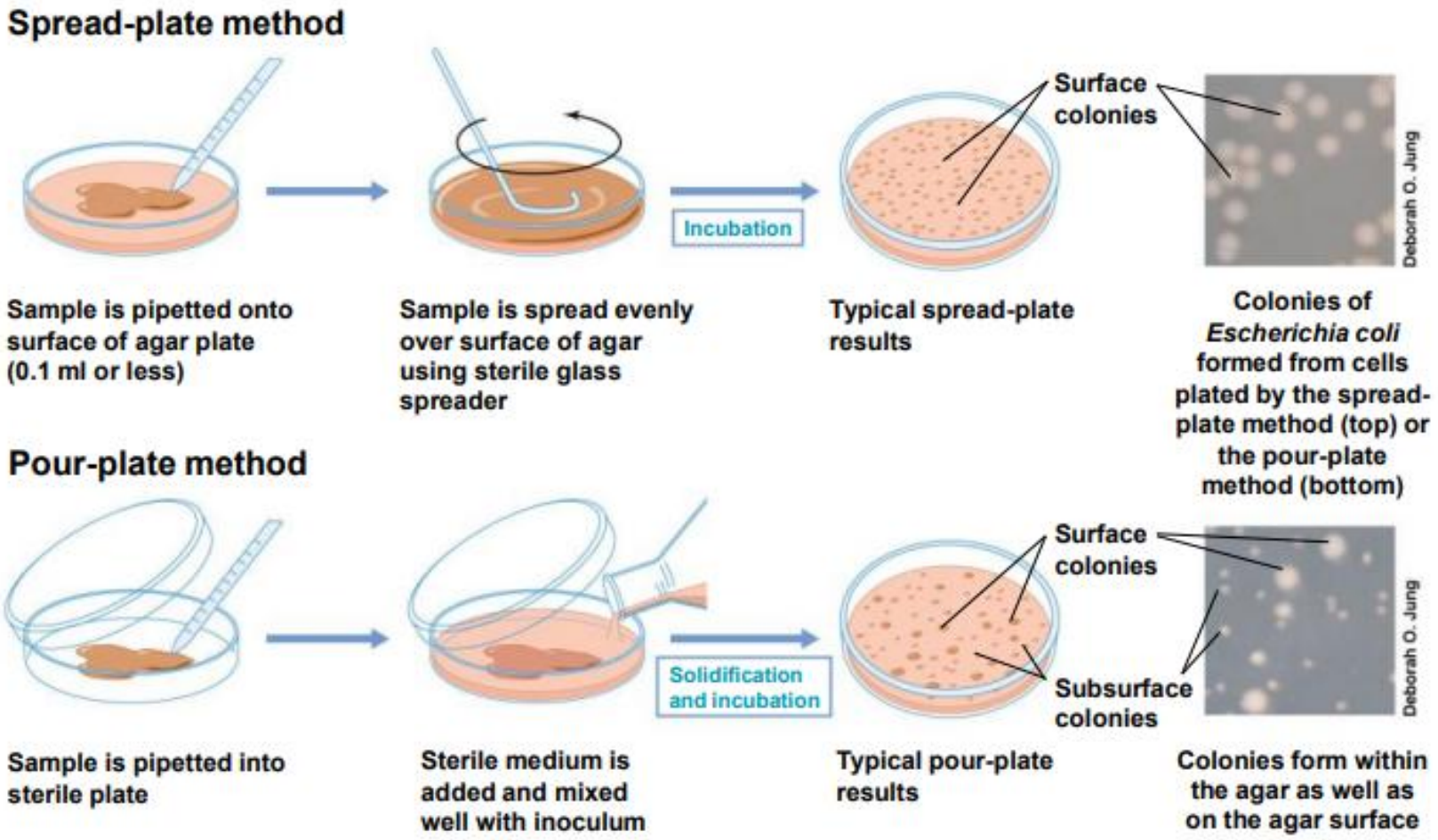

Ridges that support coverslip
Sample added here; care must be taken not to allow overflow; space between coverslip and slide is 0.02 mm ($\frac{1}{50}$mm). Whole grid has 25 large squares, a total area of 1 mm^2 and a total volume of 0.02 mm^3.
Microscopic observation; all cells are counted in large square: 12 cells (in practice, several squares are counted and the numbers averaged.)
To calculate number per milliliter of sample:
12 cells x 25 large squares x 50 x 10^3 = 1.5 x 10^7
Number /mm^2
Number /mm^3
Number /cm^3 (ml)

Diluciones seriadas y conteo de unidades formadoras de colonias = UFC (viables)

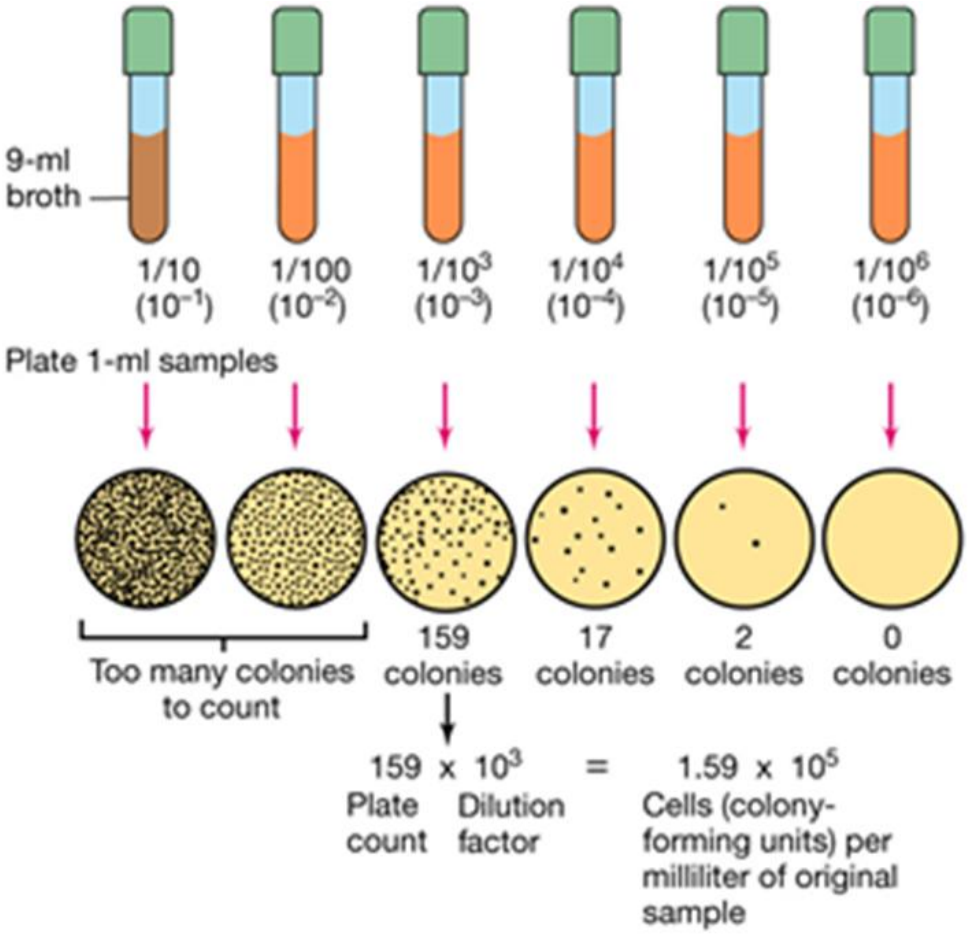


- Las diluciones seriadas son diluciones que se hacen en serie y aplicando siempre el mismo factor de dilución.

Técnicas para inocular placas (para recuentos o aislamientos)

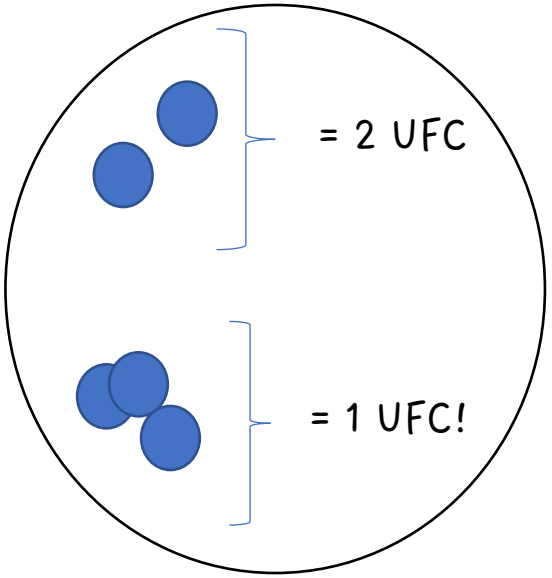


Forma de contar las colonias en las placas

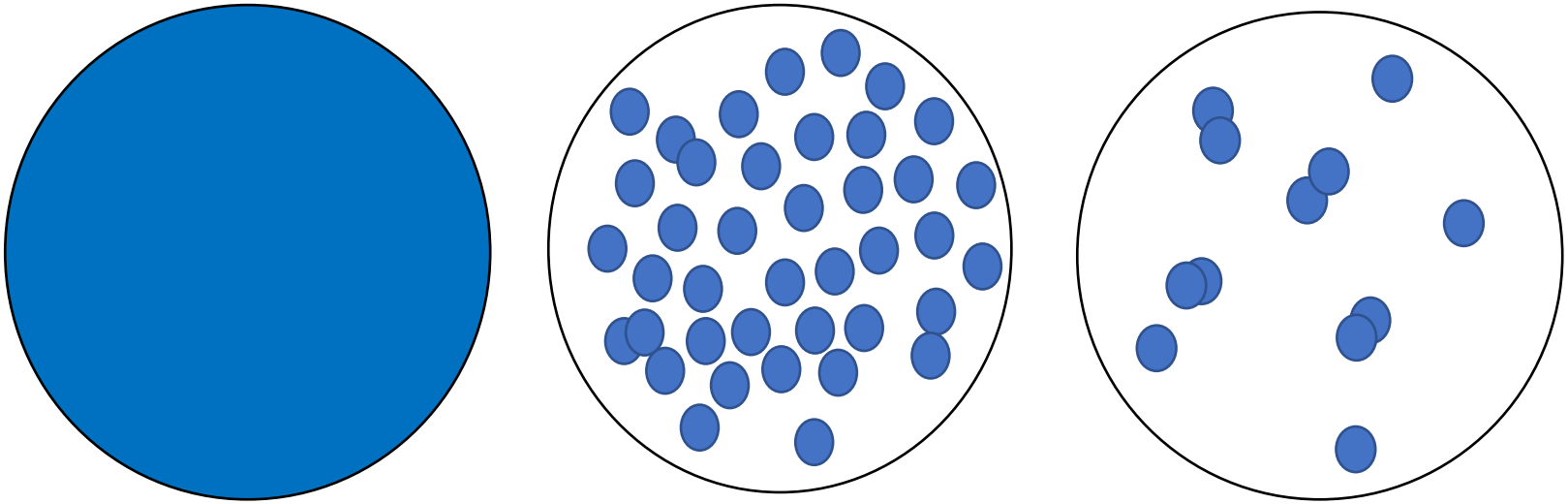


- Buscar la placa que presenta entre 30 y 300 UFC.
- Multiplicar el # de UFCs por el factor de dilución.

IMPORTANTE:

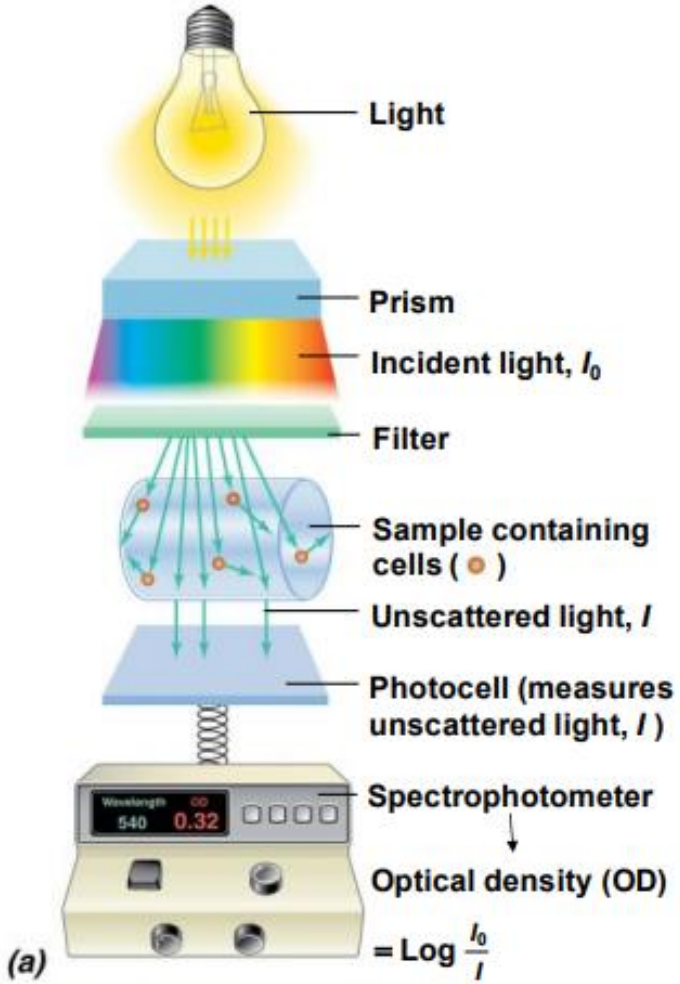


10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}

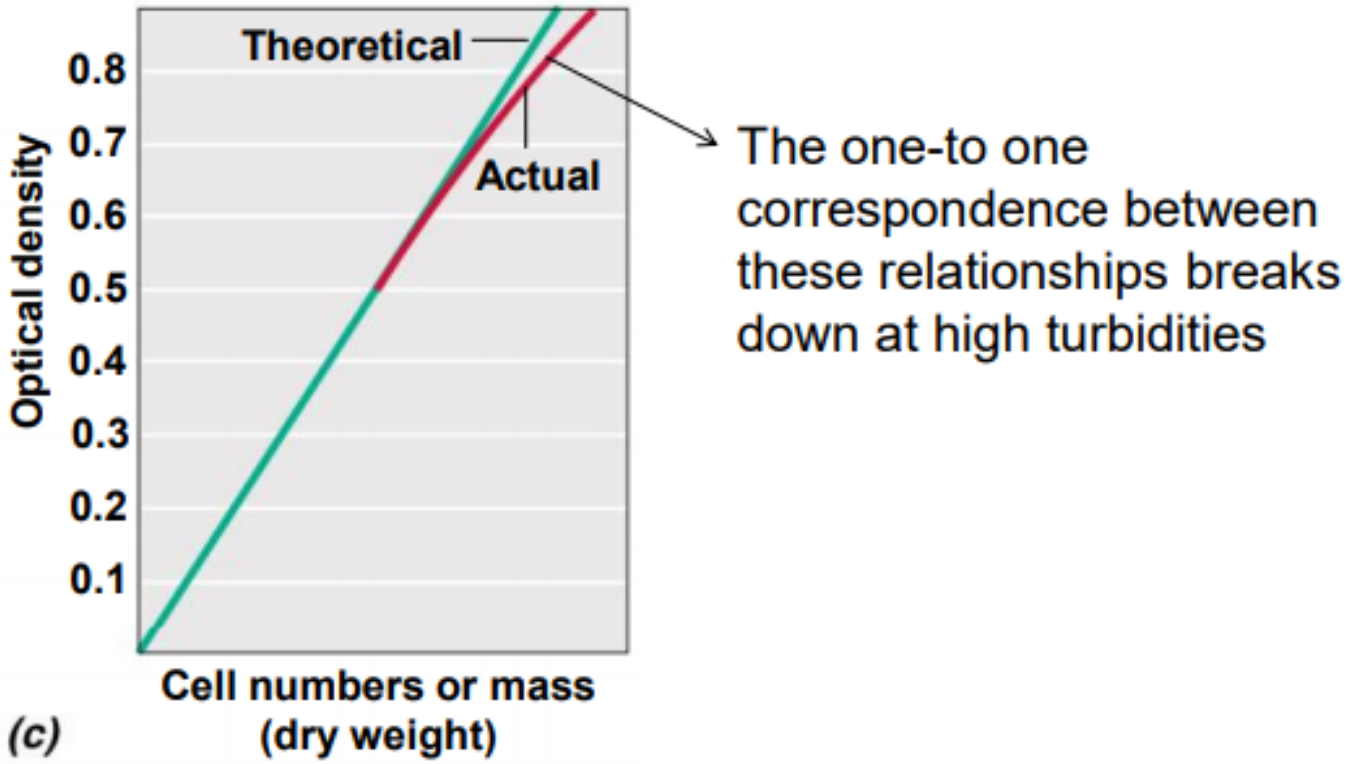


Densidad óptica

- Medición de la densidad óptica de un cultivo en un espectrofotómetro.
- Ventaja: es rápido.
- Desventaja: no permite diferenciar entre células vivas y muertas.



Otra desventaja: Ley de Lambert-Beer.



Otra desventaja: Se requiere elaborar una curva de correlación para relacionar la turbidez con la concentración en UFC/ ml.

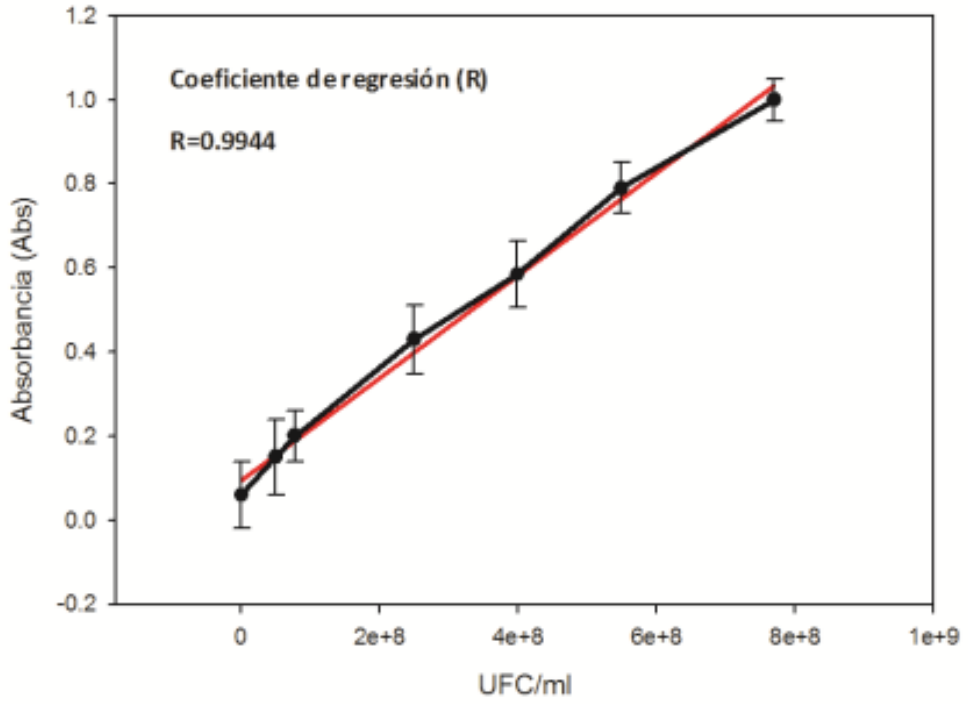


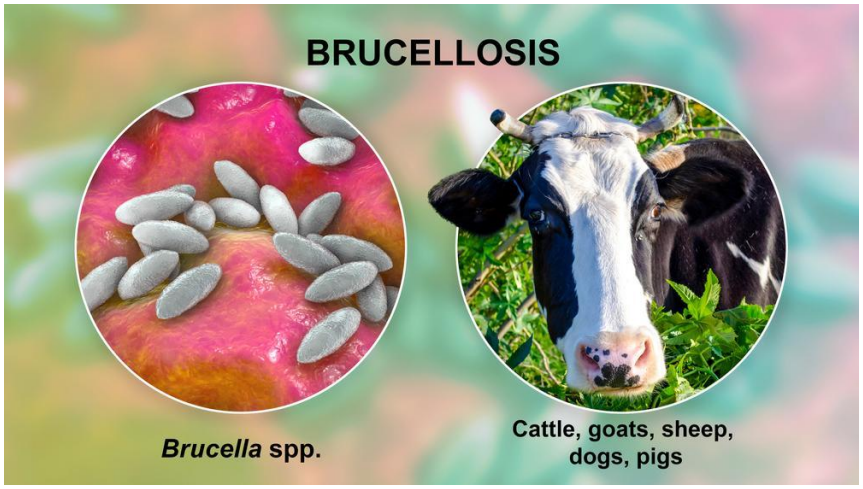
Figura 3.1. Curva de calibración Absorbancia vs UFC/ml para cultivos de *P. fluorescens*.

La ecuación de la línea de mejor ajuste es:

$$Y_{abs} = 1{,}218 \times 10^{-9}_{abs/ufcxml^{-1}} X_{ufc/ml} + 0{,}094_{abs}$$

http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2685/5_-_Caracterizaci%C3%B3n_microbiol%C3%B3gica.pdf?sequence=10&isAllowed=y

Ejemplo para *Brucella*



UFC/ml = ABS(420nm)-0,0103 / 5*10-11

Si ABS = 0.472

UFC/ml = 0,472-0,0103 / $5*10^{-11}$

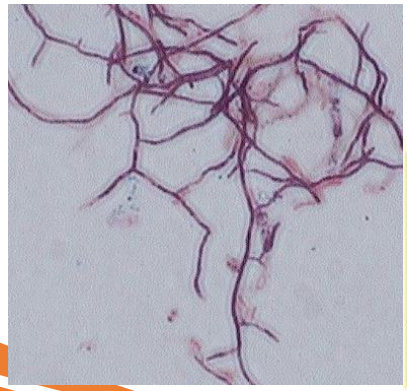
= 0,4617 / $5*10^{-11}$

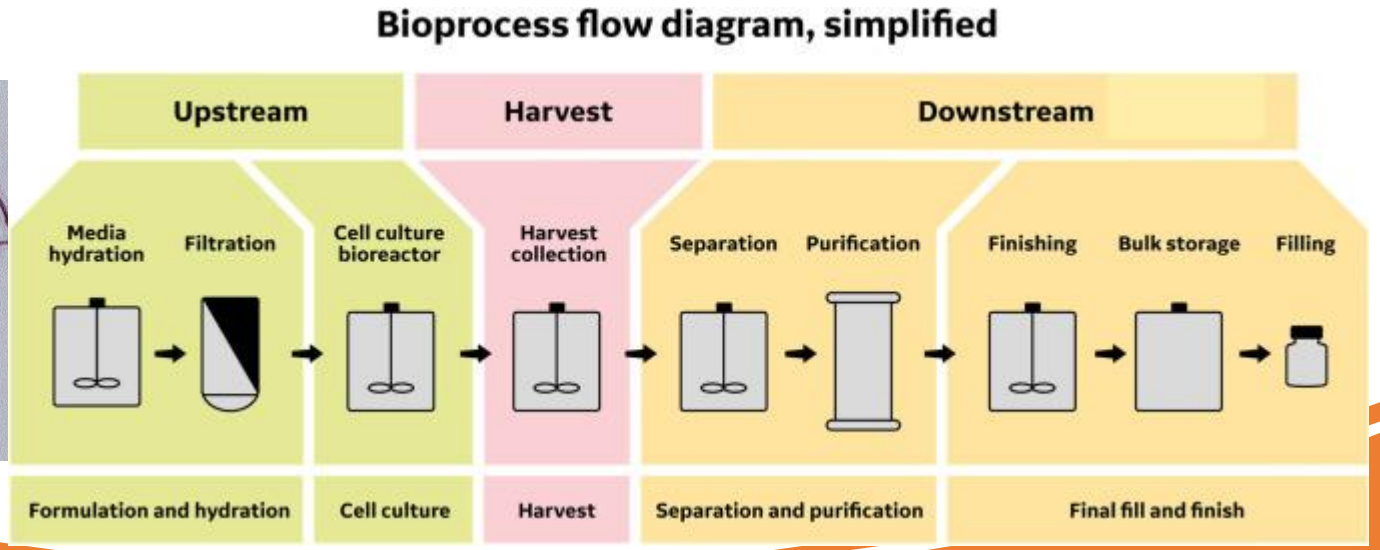
= 0,09234 $*10^{11}$

= **9.234 $*10^{9}$**

Peso seco

- Se puede cuantificar por filtración o centrifugación.
- Desventaja: No permite diferenciar entre células vivas y muertas y requiere una curva de correlación.
- Ventaja: es útil en bioprocesos y para microorganismos filamentosos (ej. Actinomicetes, hongos).



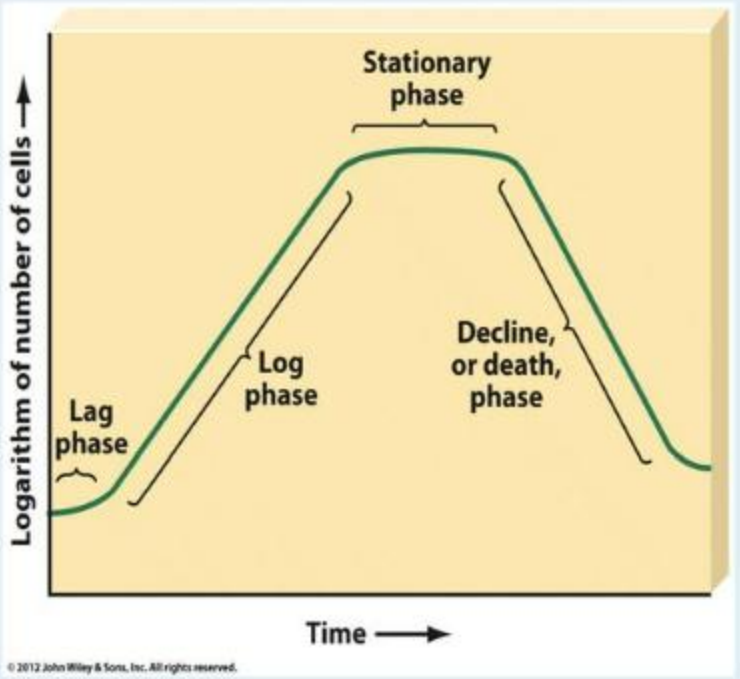


4. Curva de crecimiento microbiano y sus fases

- El crecimiento de una población microbiana se representa graficando el número de células en función del tiempo en una gráfica semilogarítmica que normalmente sigue un modelo exponencial.

Fases de la curva de crecimiento microbiano

- Lag phase
  - Adjustment to nutrients
  - Enzyme synthesis
  - DNA synthesis
- Log phase
  - Exponential cell division
- Stationary phase
  - Nutrient depletion
  - Waste build-up
- Death phase
  - More die than are produced
  - Always a few survivors



Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Inc. All rights reserved.

Aspectos cuantitativos de la fase exponencial:

El número de células se puede calcular mediante la ecuación:

$N_f=(N_i)2^n$ también como $N_t=N_0x2^n$

En donde N_f número total de células de la población

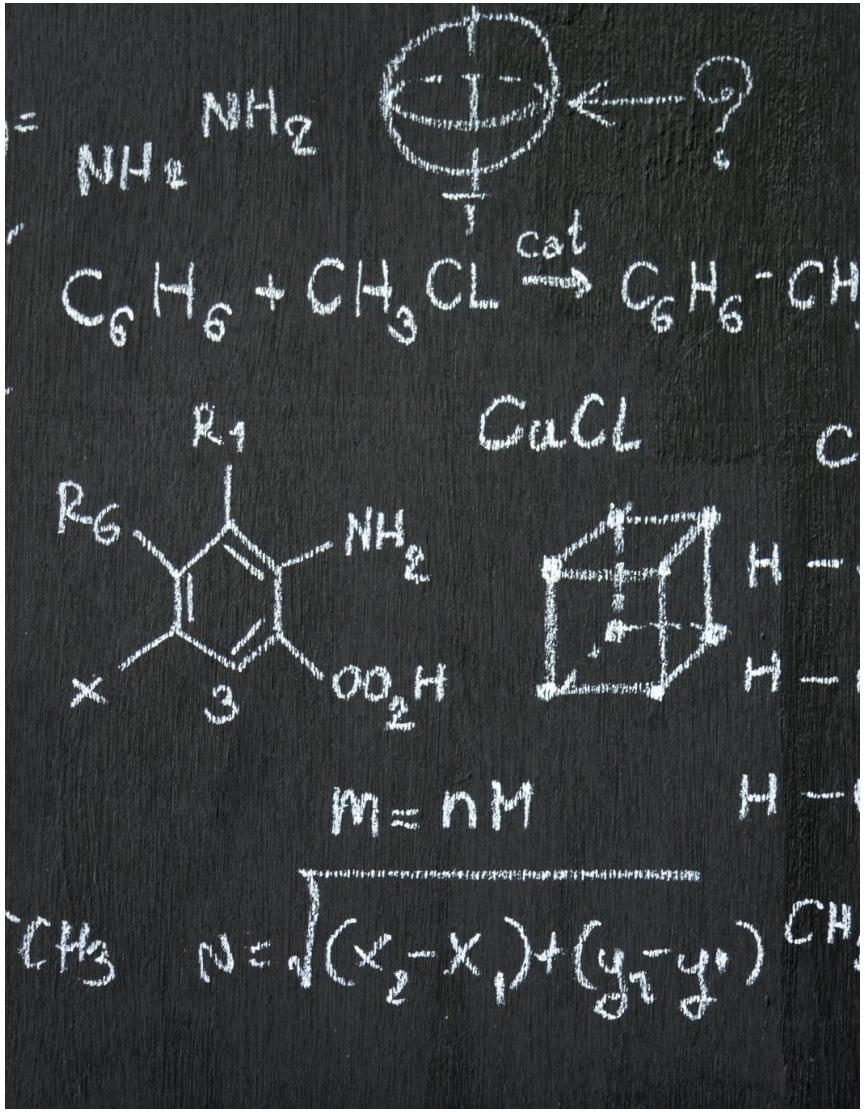
N_i número inicial de células

n Número de generaciones

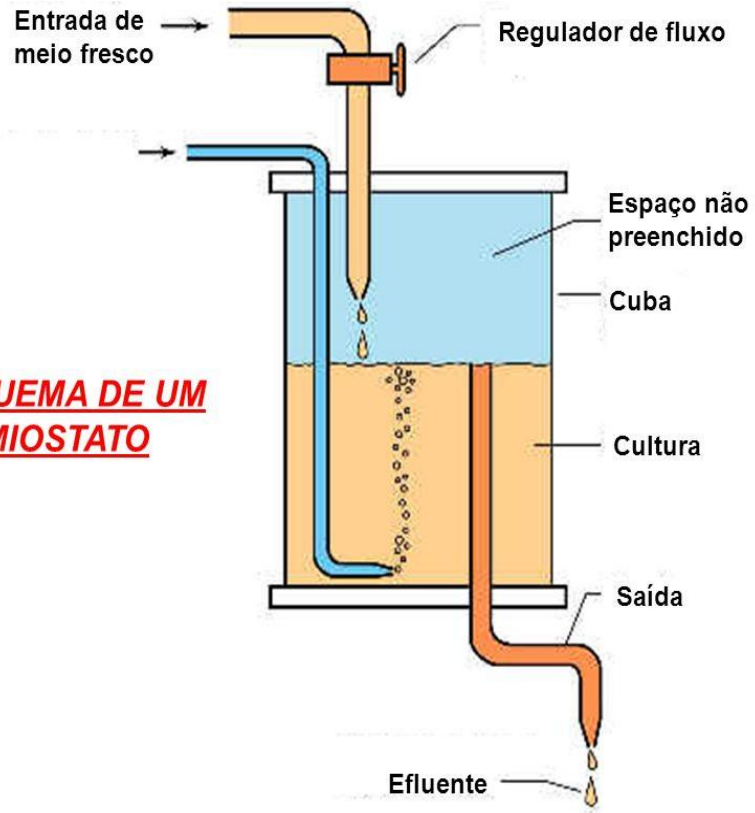
2^n Número de células en cada generación

Ejemplo de cálculo

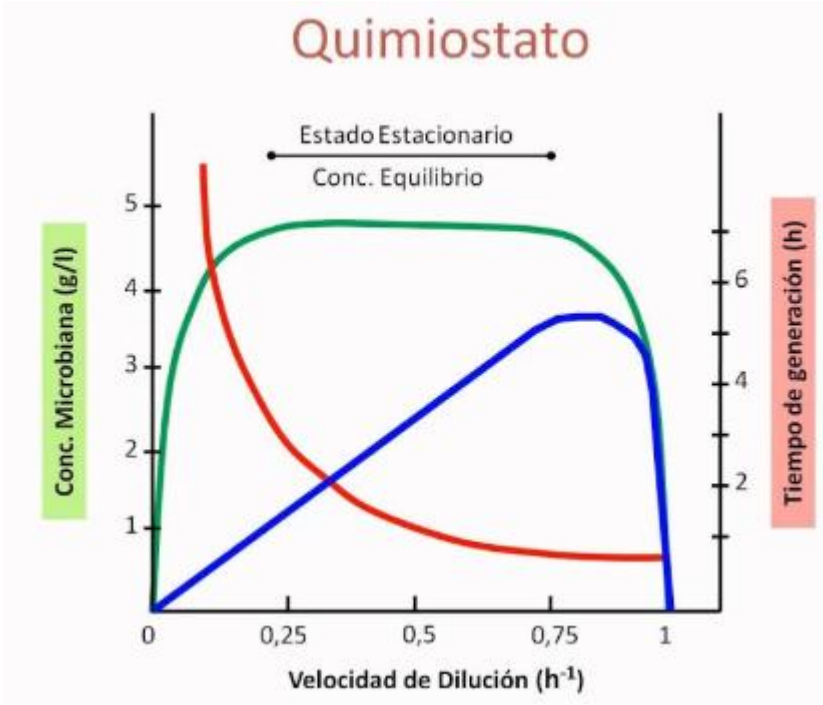
- ¿Cuál sería el número de *Staphylococcus aureus* en un sandwich, dejado cuatro horas en el interior de un automóvil?
- Número inicial de bacterias 10
- Tiempo de generación 20 minutos
- Número de generaciones: 4h=240 minutos/20 minutos: 12
- Aplicando la fórmula Nf=(Ni)2n $10x2^{12}$, 10x 4096
- Entonces el número de *S.aureus* sería: 40960



Quimiostato: Cultivo continuo para mantener los microroganismos en una misma fase de crecimiento durante períodos largos de tiempo.



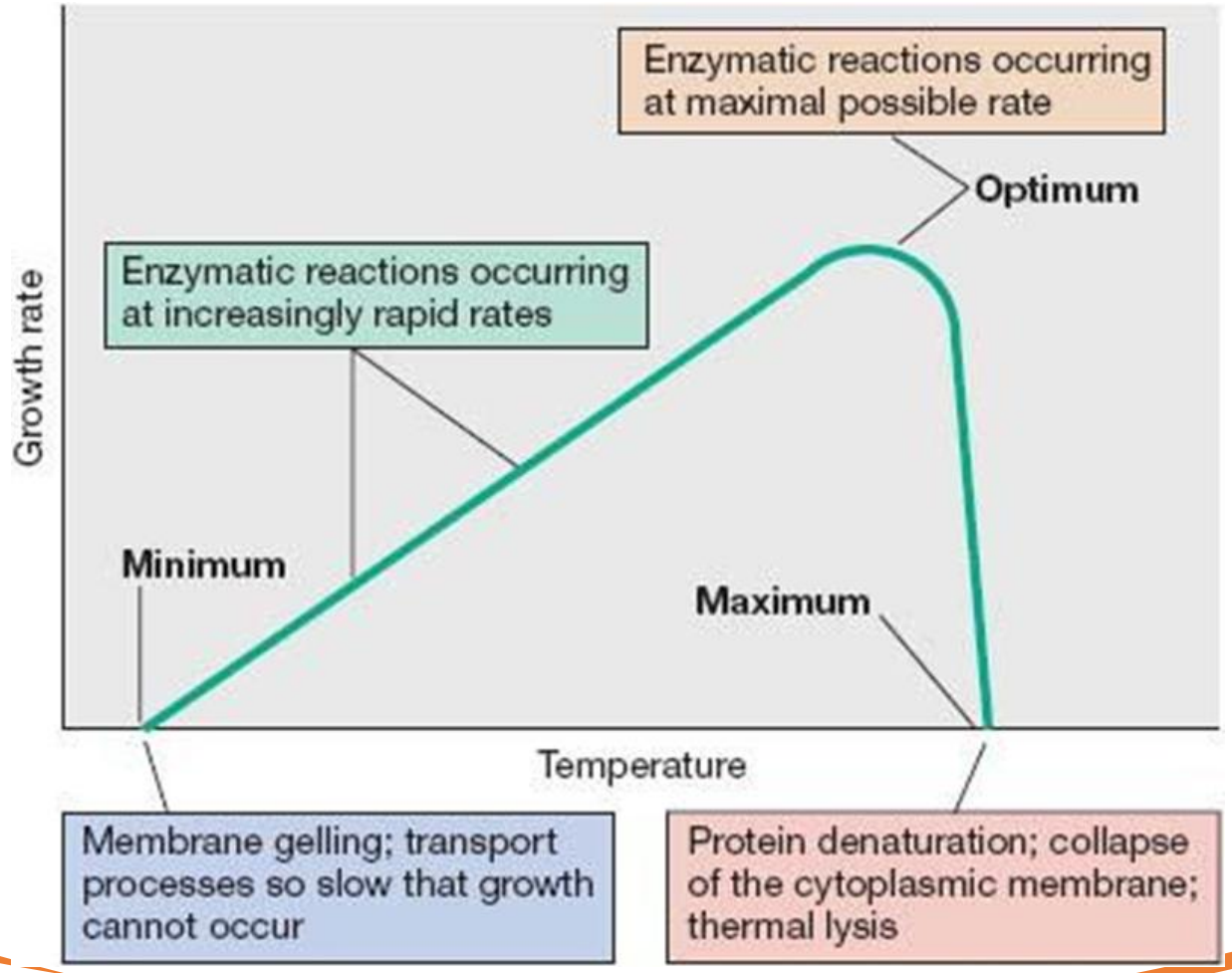
ESQUEMA DE UM QUIMIOSTATO



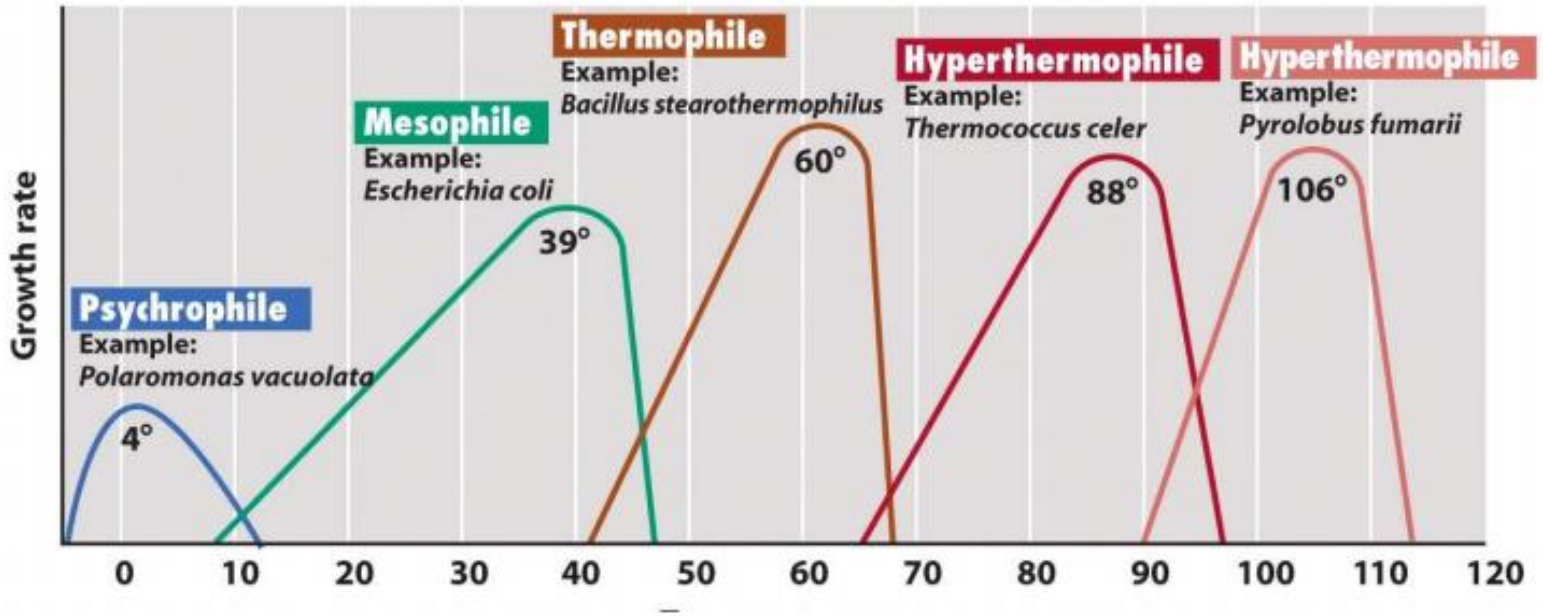
5. Factores que afectan el crecimiento microbiano

- Cada microorganismo tiene un valor mínimo, óptimo y máximo para factores como:
  - Temperatura
  - pH
  - Atmósfera (concentración de O_2)
  - Disponibilidad de agua

Efecto de la temperatura

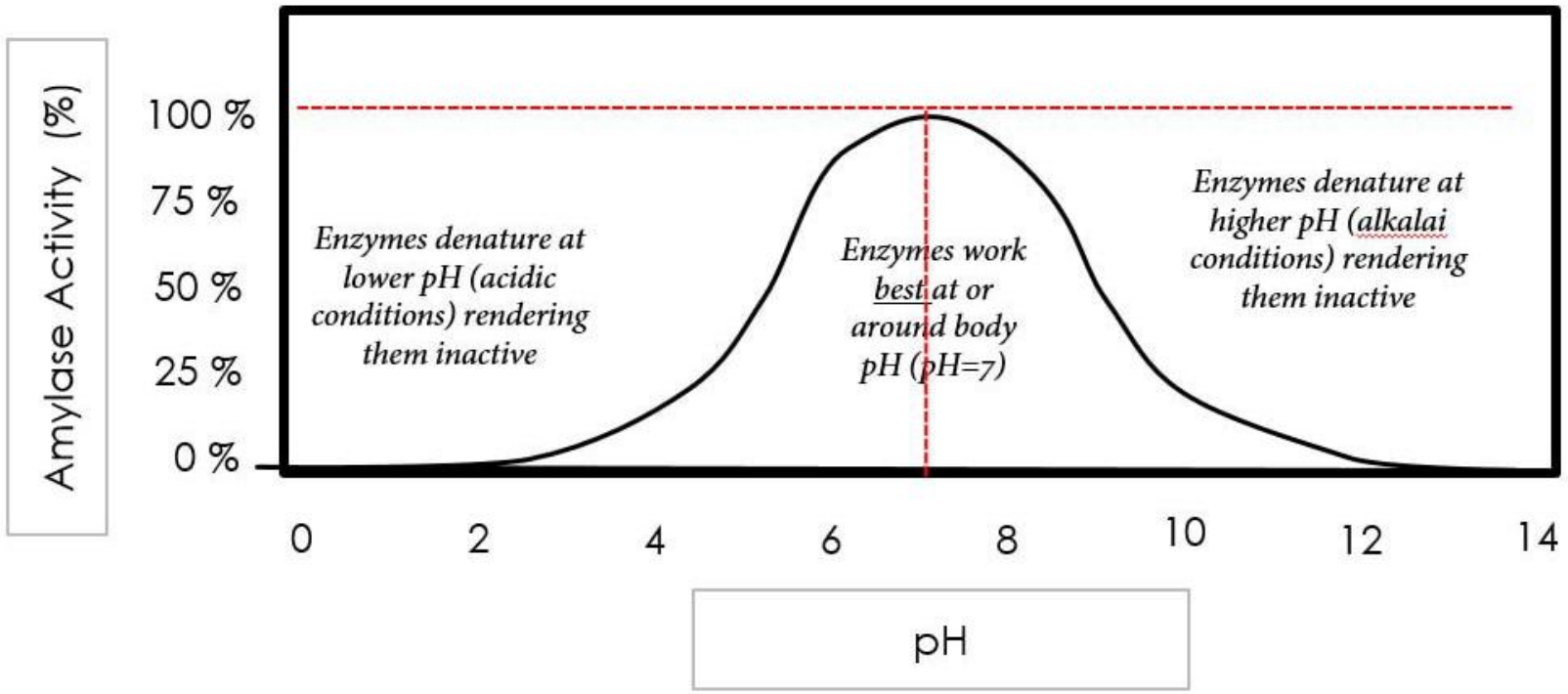


Clasificación por temperatura óptima de crecimiento



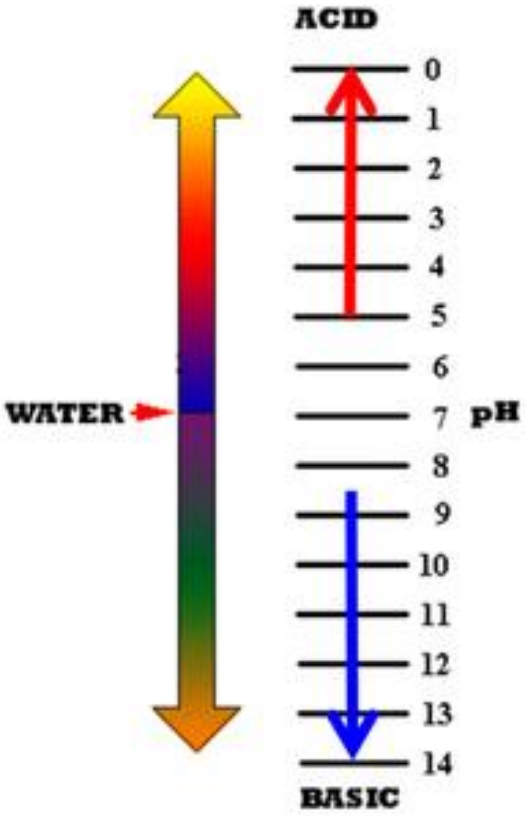
Los patógenos humanos son mesófilos

El pH afecta la actividad enzimática

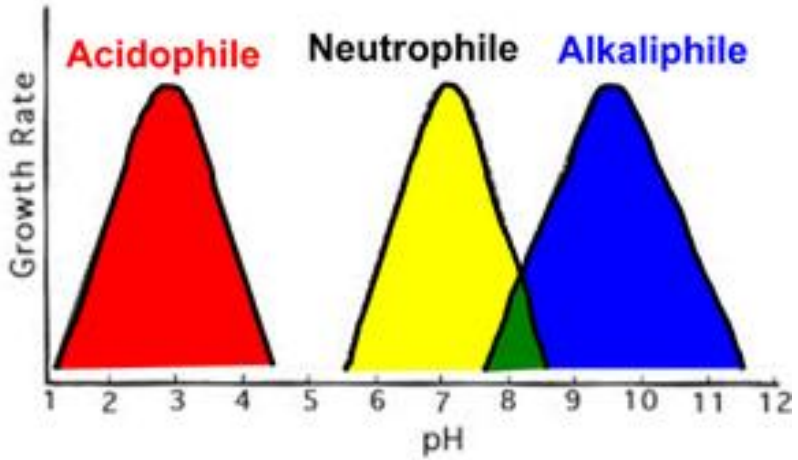


https://www.scientistcindy.com/ex-17---ph-and-microbial-growth.html

Clasificación por pH óptimo de crecimiento



- based on the pH that bacteria can grow in they can be placed into 3 major categories



14

https://quizlet.com/143521167/microbiology-microbial-growth-flash-cards/

Atmósfera (concentración de O_2)

- El O_2 genera radicales libres. Sin embargo, algunos microorganismos han desarrollado mecanismos para contrarrestar los efectos de los radicales libres, por lo que pueden usar el O_2 como aceptor final de electrones en su metabolismo.
- Sin embargo, otros microroganismos carecen de estos mecanismos, por lo que deben utilizar otros tipos de moléculas como aceptores finales de electrones.

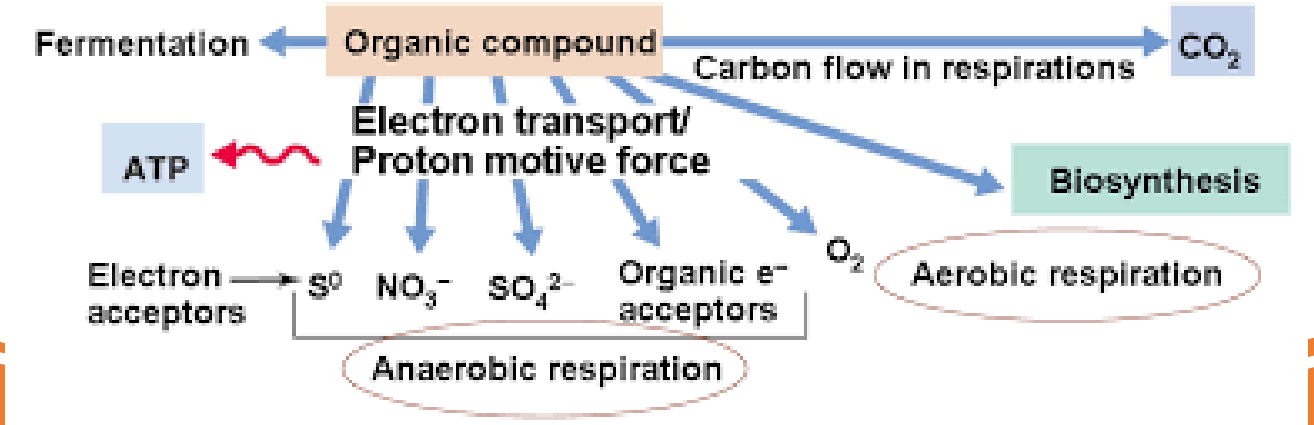


TABLE 6.1 The Effect of Oxygen on the Growth of Various Types of Bacteria

	a. Obligate Aerobes	b. Facultative Anaerobes	c. Obligate Anaerobes	d. Aerotolerant Anaerobes	e. Microaerophiles
Effect of Oxygen on Growth	Only aerobic growth; oxygen required.	Both aerobic and anaerobic growth; greater growth in presence of oxygen.	Only anaerobic growth; ceases in presence of oxygen.	Only anaerobic growth; but continues in presence of oxygen.	Only aerobic growth; oxygen required in low concentration.
Bacterial Growth in Tube of Solid Growth Medium					
Explanation of Growth Patterns	Growth occurs only where high concentrations of oxygen have diffused into the medium.	Growth is best where most oxygen is present, but occurs throughout tube.	Growth occurs only where there is no oxygen.	Growth occurs evenly; oxygen has no effect.	Growth occurs only where a low concentration of oxygen has diffused into medium.
Explanation of Oxygen's Effects	Presence of enzymes catalase and superoxide dismutase (SOD) allows toxic forms of oxygen to be neutralized; can use oxygen.	Presence of enzymes catalase and SOD allows toxic forms of oxygen to be neutralized; can use oxygen.	Lacks enzymes to neutralize harmful forms of oxygen; cannot tolerate oxygen.	Presence of one enzyme, SOD, allows harmful forms of oxygen to be partially neutralized; tolerates oxygen.	Produce lethal amounts of toxic forms of oxygen if exposed to normal atmospheric oxygen.

© 2013 Pearson Education, Inc.

Cultivo de anaerobios

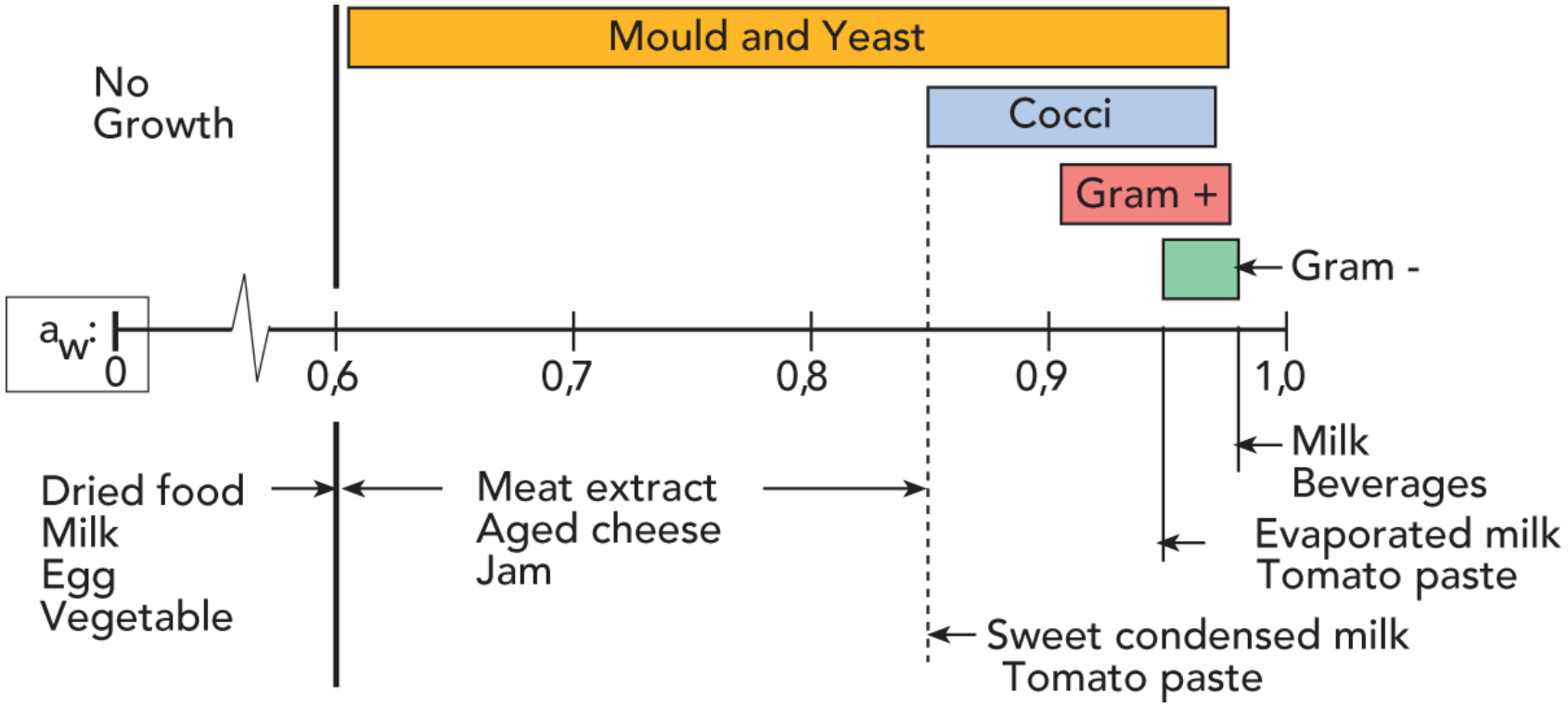
Jarra de anaerobiosis

$$NaHCO_3 + NaBH_4 + O_2 \rightarrow CO_2 + H_2O + H_2$$

Disponibilidad de agua

- Los microorganismos necesitan agua, en una forma disponible.
- La mejor forma de medir la disponibilidad de agua es mediante la actividad de agua (aw).
- La aw se define como la presión parcial de vapor de agua en equilibrio con una sustancia o solución, dividido por la presión parcial de vapor de agua en condiciones estándar (presión de vapor parcial del agua pura a la misma temperatura).
- La aw de se puede reducir aumentando la concentración de solutos en la fase acuosa mediante la extracción del agua o mediante la adición de solutos como sal o azúcar, lo que aumenta la presión osmótica.

Disponibilidad de agua



Clasificación por a_w

Halófilos

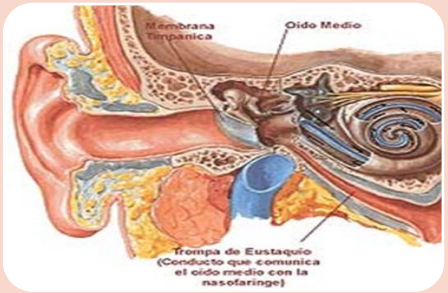
Altas concentraciones de sal

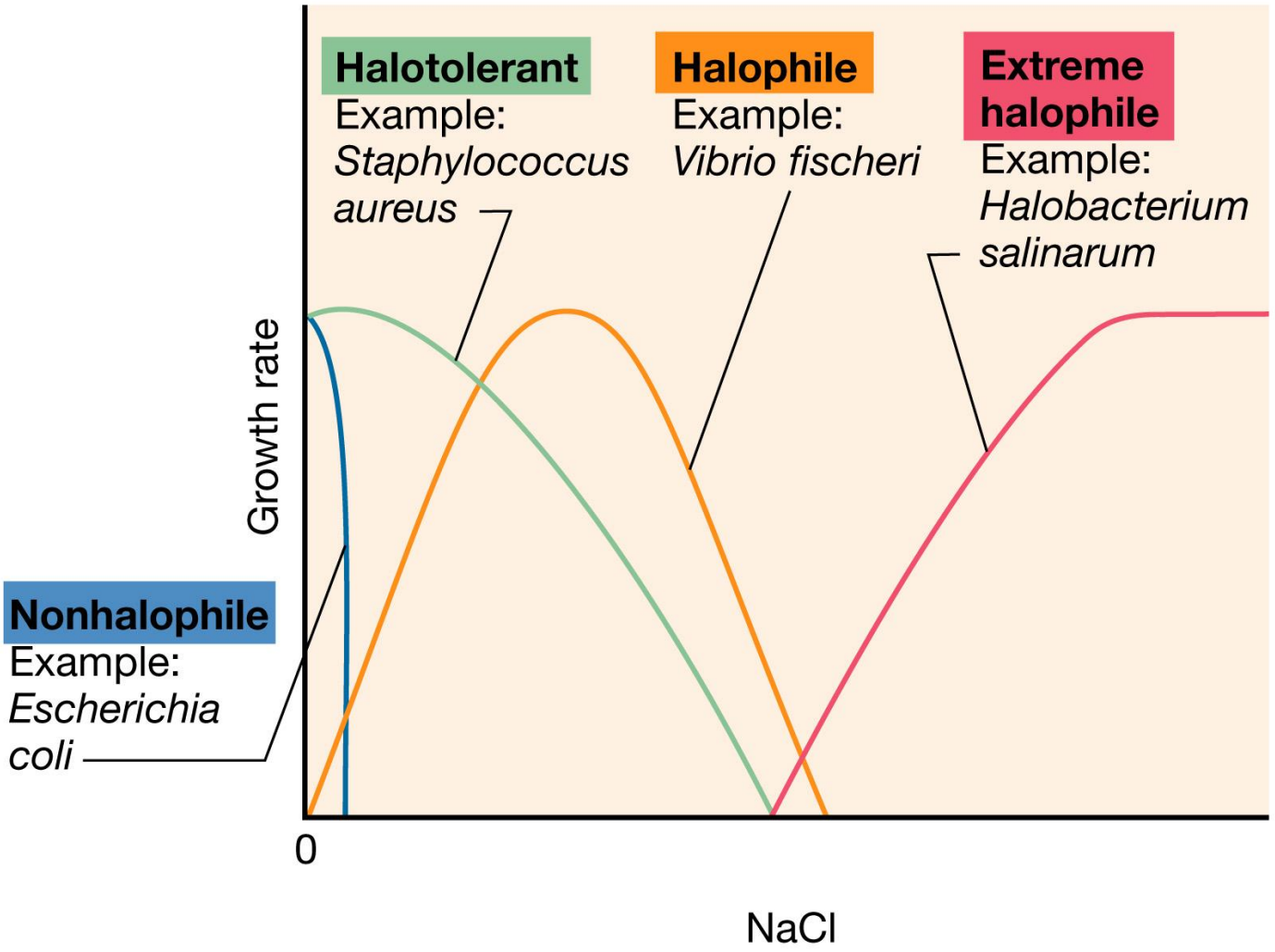
Osmófilos

Altas concentraciones de azúcar

Xerófilos

Ambientes secos




Halotolerant
Example:
Staphylococcus aureus
Halophile
Example:
Vibrio fischeri
Extreme halophile
Example:
Halobacterium salinarum
Nonhalophile
Example:
Escherichia coli
Growth rate
0
NaCl

Recordatorio para el miércoles 25/02/2026:

Llevar un guante de cocina a la clase de laboratorio.

Actividad de Análisis de Problemas

Actividad: Diseño de condiciones óptimas de cultivo para microorganismos con requerimientos específicos

Cada grupo recibirá un **microorganismo con características específicas, para el cual deben proponer:**

- Tipo de medio de cultivo (general, enriquecido, selectivo, mínimo, definido, complejo).
- Fuente de carbono y energía.
- Fuente de nitrógeno.
- Requerimientos especiales (vitaminas, cofactores, factores de crecimiento).
- Condiciones físicas:
  - Temperatura
  - pH
  - Atmósfera (aerobio, anaerobio, microaerófilo, CO_2)
  - Agitación o no
- Tipo de cultivo (batch, fed-batch, continuo, estático, biofilm, etc.).
- Justificación fisiológica de cada decisión.
- ¿Cómo sería su curva de crecimiento si se cultivara en condiciones no óptimas?

1. Daniel, Sofía G., Ignacio y Priscilla Rojas: Bacteria mesófila, aerobio estricto, aislada de suelo agrícola
2. Sofía, Maciel, Viviana, Silvana, Josué: Bacteria halófila moderada aislada de salinas costeras.
3. Melany, Brenda, Milena, Gabriel y David: Bacteria termófila aislada de una fuente hidrotermal, quimioautótrofa oxidante de azufre.
4. Gabriel, Juan David, Adrián, María Jesús, Jimena Arguedas: Levadura facultativa utilizada en producción de bioetanol a partir de xilosa.
5. Brandon, Brandom, Ignacio F., Justin, Sebas J: Bacteria anaerobia estricta del género *Clostridium* productora de ácidos orgánicos.
6. Alejandro, J. Daniel, Maríamalia, Valentina, Mónica: Bacteria psicrótrofa contaminante de alimentos refrigerados.
7. Jimena S., Jimena C., Sofía J., Mariana E: Bacteria microaerófila gastrointestinal con requerimiento de factores de crecimiento.
8. Christy, Caleb, Mauro, Ignacio, Melissa: Cianobacteria fotoautótrofa de agua dulce.
9. Priscilla, Steven, Gabriela y Antony: Actinobacteria productora de antibióticos secundarios aislada de hormigas de una selva tropical.
10. Alex, Lucía, Alejandro, Jesús, Dayana: Bacteria metilotrófica que utiliza metanol como única fuente de carbono.
11. Sofía Montero, Alesandra, Mattías, Mariángel Leiva: Células bacterianas que forman biopelículas en superficies industriales.
12. Helena A., Helena, Francisco, Mariángel A y R: Bacteria acidófila aislada de drenaje ácido de mina.
13. Ma Paula, Fátima, Sebas Peraza, Paulina: Hongo filamentoso ambiental aislado de guano de murciélago, con pobre crecimiento en medios sintéticos definidos.